

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Ichiro YAMASHITA  
SERIAL NO: New Application  
FILED: Herewith  
FOR: HIGH ESTROGEN-SENSITIVE MEDAKA FISH

GAU:  
EXAMINER:



REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2000-247729	August 17, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)  
☐ are submitted herewith  
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland  
Registration Number 21,124



22850

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

J1036 U.S. PTO  
09/893666  
06/29/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 8月17日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-247729

出 願 人

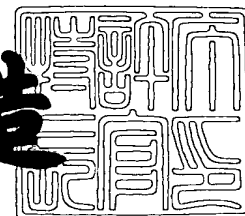
Applicant(s):

広島大学長

2000年12月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3102800

【書類名】 特許願

【整理番号】 A000003885

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成12年 8月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00  
C12N 15/90

【発明の名称】 エストロゲン高感受性メダカ

【請求項の数】 10

【発明者】  
【住所又は居所】 広島県東広島市西条町下三永 3 5 4 - 1 2 9  
【氏名】 山下 一郎

【特許出願人】  
【識別番号】 391012648  
【氏名又は名称】 広島大学長

【代理人】  
【識別番号】 100058479  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 鈴江 武彦  
【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】  
【識別番号】 100084618  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】  
【識別番号】 100068814  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100092196

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 良郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100088683

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 誠

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9110050

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 エストロゲン高感受性メダカ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に記載されている塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 2】 配列番号 1 に記載されている塩基配列の211位から1935位までを有するポリヌクレオチド。

【請求項 3】 請求項 2 に記載のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項 4】 請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 5】 請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドを遺伝子導入した遺伝子組み換えメダカ。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の遺伝子組み換えメダカを、エストロゲン存在下で生育させることを特徴とする血栓を形成したメダカの作成方法。

【請求項 7】 請求項 5 に記載の遺伝子組み換えメダカを、エストロゲン存在下で生育させることにより得られる血栓を形成したメダカ。

【請求項 8】 エストロゲン様作用性物質の検査方法において、請求項 5 に記載の遺伝子組み換えメダカを、検査用の水中で生育させる工程と

前記メダカに血栓が形成されるか否かを観察する工程とを具備することを特徴とする方法。

【請求項 9】 前記検査用の水が、環境から採取した水であることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 前記検査用の水が、被検物質を添加した水であることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、メダカ由来のエストロゲン受容体遺伝子を組込んだ遺伝子組み換えメダカ、即ちエストロゲン高感受性メダカに関する。

本発明の遺伝子組み換えメダカは、エストロゲン様内分泌攪乱化学物質を検出する際に利用可能であることに加えて、血栓症の発症メカニズムを解明するための実験動物および血栓症の治療薬を開発する際のバイオアッセイ系として有用である。

#### 【 0 0 0 2 】

##### 【従来の技術】

近年、環境中の化学物質による生物の内分泌系への影響に関して研究が活発化してきており、関心が高まっている。生物の内分泌系を攪乱する作用を有する多くの化学物質が、エストロゲン様の作用をすることから、研究の多くは、女性ホルモンであるエストロゲンを対象としている。

#### 【 0 0 0 3 】

河川においてもエストロゲン様化学物質の汚染は、地球規模の社会問題となっている。そこで本発明において、河川におけるエストロゲン様作用性物質を検出するにあたり、実験動物として優れた点を有しているメダカに着目した。ところがメダカは、極低濃度のエストロゲンには反応しないため、環境水検査用の水生動物として使用できない問題点を有していることを、本発明を為すにあたり新たに見出した。

#### 【 0 0 0 4 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上記事情に鑑み、本発明は、極低濃度のエストロゲンに反応する遺伝子組み換えメダカを提供すること、並びに前記メダカを用いて血栓を形成したメダカを作成する方法、および当該方法により作成された血栓を形成したメダカを提供することを目的とする。更に本発明は、前記メダカを用いてエストロゲン様作用性物質を検査する方法を提供することを目的とする。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記目的を達成するため、メダカ由来のエストロゲン受容体遺伝

子を組込んだ遺伝子組み換えメダカ、即ちエストロゲン高感受性メダカを作成することに成功し、本発明に至った。

【0006】

即ち、本発明は以下に記載の手段により達成された。

【0007】

(1) 配列番号1に記載されている塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【0008】

(2) 配列番号1に記載されている塩基配列の211位から1935位までを有するポリヌクレオチド。

【0009】

(3) (2)に記載のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質。

【0010】

(4) (1)または(2)に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【0011】

(5) (1)または(2)に記載のポリヌクレオチドを遺伝子導入した遺伝子組み換えメダカ。

【0012】

(6) (5)に記載の遺伝子組み換えメダカを、エストロゲン存在下で生育させることを特徴とする血栓を形成したメダカの作成方法。

【0013】

(7) (5)に記載の遺伝子組み換えメダカを、エストロゲン存在下で生育させることにより得られる血栓を形成したメダカ。

【0014】

(8) エストロゲン様作用性物質の検査方法において、(5)に記載の遺伝子組み換えメダカを、検査用の水中で生育させる工程と、前記メダカに血栓が形成されるか否かを観察する工程とを具備することを特徴とする方法。

【0015】

(9) 前記検査用の水が、環境から採取した水であることを特徴とする(8)記載の方法。

【0016】

(10) 前記検査用の水が、被検物質を添加した水であることを特徴とする(8)記載の方法。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0018】

本発明において、エストロゲン受容体遺伝子をクローニングする際に使用するメダカおよびクローニングされた遺伝子を組込む際に使用するメダカは、何れも Oryzias latipes に属するものであれば限定されない。本発明において使用したメダカは、名古屋大学生物分子応答研究センターから入手し、餌としてテトラミン (Tetra) を 1~10 mg/day 程度与え、飼育したものである。

【0019】

尚メダカの受精卵は、凍結保存した後、必要に応じて発生を再開させる技術が確立されていないため、寄託することができない。そのため、本発明に使用したメダカについては発明者の責任において発明者の管理下に飼育されている。上述のとおり、本発明は、発明者の飼育するメダカに限定されず任意のメダカを利用することができる。

【0020】

〔メダカ由来エストロゲン受容体遺伝子のクローニング〕

本発明のメダカ由来エストロゲン受容体遺伝子は、メダカ成魚の肝臓細胞 cDNA ライブラリーからクローニングした。詳しくは、ヒト由来エストロゲン受容体遺伝子の核酸配列を元にプローブを作成し、このプローブを用いて前記 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、メダカ由来のエストロゲン受容体 cDNA をクローニングした。

【0021】

クローニングされたエストロゲン受容体 cDNA の塩基配列を決定し、当該塩



基配列から予想されるアミノ酸配列を決定した。このメダカ由来エストロゲン受容体 cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列を、下記配列表の配列番号 1 に記す。

#### 【 0 0 2 2 】

##### 〔組換えベクターの作成〕

上記方法によりクローニングされたメダカ由来エストロゲン受容体 cDNA を、ベクターに組込む。当該 cDNA のベクターへの組込みは、既知の遺伝子工学的手法により行うことができる。この操作によりメダカ由来エストロゲン受容体遺伝子の挿入された組換えベクターを作成することができる。

#### 【 0 0 2 3 】

本発明で使用されるベクターは、挿入された外来遺伝子のコードする蛋白質を発現することが可能であれば特に限定されない。本発明においては、プロモーター配列およびポリ(A)シグナル配列を有するプラスミドを使用することが好ましい。例えば、後述の実施例に記載されるとおり、メダカアクチンプロモーターの DNA 断片を含むプラスミド、および SV40 ポリ(A)シグナルの DNA 断片を含むプラスミドから、それぞれの DNA 断片を精製し、新たなプラスミドベクターを作成して使用してもよい。

#### 【 0 0 2 4 】

##### 〔遺伝子組み換えメダカの作成〕

上述のように作成された組換えベクターを、メダカ受精卵の核に導入して、エストロゲン受容体遺伝子を過度に発現する遺伝子組み換えメダカを作成する。本発明で使用される形質転換の対象となるメダカ受精卵は、受精後 1 時間以内の一細胞期もしくは二細胞期のものが好ましい。組換えベクターの受精卵への導入は、既知のマイクロインジェクションにより行うことができる。

#### 【 0 0 2 5 】

遺伝子導入の操作を受けた受精卵は、好ましくはメダカ生理食塩水 (7.5 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.02 g/L NaHCO<sub>3</sub>) 中で 25~28℃ にて孵化させる。孵化したメダカを成魚になるまで約 4 ヶ月間飼育する。

#### 【 0 0 2 6 】

この成魚のなかから、実際に遺伝子が導入されているメダカを以下の手法により選抜する。まず、前記成魚からDNAを抽出し、次いで抽出されたDNAのなかからエストロゲン受容体遺伝子をPCR反応により増幅し、増幅されたDNA断片を電気泳動する。野生メダカが染色体に本来有しているエストロゲン受容体遺伝子はイントロンを含むが、遺伝子導入されたエストロゲン受容体遺伝子はイントロンを含まないcDNAであるため、両者は電気泳動のDNAバンドのサイズにより区別して検出される。この検出操作により、遺伝子導入されたメダカを選抜することができる。ただし、この段階で選抜されたメダカは、当該遺伝子が生殖細胞（精子あるいは卵子）の染色体に導入されたか否かは定かではない。

## 【 0 0 2 7 】

よって、引き続き以下の手法により、生殖細胞の染色体に遺伝子が導入されているメダカを選抜する。まず、先の手法により遺伝子導入されたことが確認されたメダカを、野生メダカと交配させて子孫をつくらせる。この子孫のうち、遺伝子導入されたエストロゲン受容体遺伝子を受け継いでいるメダカを確認することができれば、その親のメダカは、生殖細胞の染色体にエストロゲン受容体遺伝子が組み込まれたものであることが分かる。尚、子孫のメダカが導入遺伝子を受け継いでいることは、上述の電気泳動によりDNAバンドのサイズの違いとして確認することができる。

## 【 0 0 2 8 】

このようにして選抜された、染色体にエストロゲン受容体遺伝子が組み込まれているメダカは、代々、当該遺伝子を子孫に伝達することができ、これが本発明の目的とする遺伝子組み換えメダカである。

## 【 0 0 2 9 】

本発明の遺伝子組み換えメダカにおけるエストロゲン受容体遺伝子の発現を、RT-PCR反応により調べたところ、エストロゲン受容体遺伝子の発現が確認された。一方、野生メダカにおいて当該遺伝子の発現はほとんど検出されなかった。このように、本発明の遺伝子組み換えメダカは、組込まれた遺伝子の発現によりエストロゲン受容体が増大しているために、極微量のエストロゲンに対しても感受性を示すと考えられる。

【 0 0 3 0 】

[血栓を形成したメダカの作成]

野生メダカに血栓を形成させることが可能なエストロゲン濃度より低い濃度のエストロゲン存在下で、本発明の遺伝子組み換えメダカを生育させることにより、血栓を形成したメダカを作成できることを、本発明において見出した。

【 0 0 3 1 】

血栓を形成させるために使用する遺伝子組み換えメダカは、実体顕微鏡下で血栓が形成されたことを確認することが容易であるため、受精後12～24時間までの胚が好ましい。本発明の遺伝子組み換えメダカに血栓を形成させるために、生育環境中に含有させるエストロゲンの濃度は、10～20 ng/Lで充分であるが、好ましくは100～200 ng/Lである。尚、野生メダカは、血栓を形成するために4 mg/L以上のエストロゲンを必要とする。エストロゲン存在下で生育する期間としては、3～4日間を要する。生育条件は、通常メダカを飼育する条件と同様でよい。

【 0 0 3 2 】

血栓が形成されたことは実体顕微鏡の下で確認することができる。

【 0 0 3 3 】

このようにして血栓を形成したメダカは、血栓症の治療研究のために有用なものである。

【 0 0 3 4 】

[エストロゲン様作用性物質の検査方法]

本発明の遺伝子組み換えメダカを、エストロゲン様作用を有するかどうかを調べたい検査用の水中で生育させ、前記メダカに血栓が形成されるか否かを観察することにより、エストロゲン様作用性物質の有無を検出することができる。

【 0 0 3 5 】

エストロゲン様作用性物質を検出するために使用する遺伝子組み換えメダカは、実体顕微鏡下での観察が容易であることから、受精後12～24時間までの胚が好ましい。

【 0 0 3 6 】

検査用の水とは、エストロゲン様作用性物質が含まれていることが疑われる環

境（河川等）から採取してきた水であってもよいし、エストロゲン様作用をすることが疑われる任意の化学物質を被検物質として添加した水であってもよい。前者の環境から採取した水を使用した場合は、環境水中にエストロゲン様物質が含まれているか否かを検査することができ、後者の被検物質を添加した水は、被検物質のエストロゲン様作用性を検査することができる。

#### 【0037】

検査用の水中に被検物質を添加する場合、その濃度は、10 ng/L～1 mg/L が好ましい。検査用の水中で生育する期間としては、3～6日間が適切である。生育条件は、通常メダカを飼育する条件と同様でよい。

#### 【0038】

血栓が形成されたことは実体顕微鏡の下で観察することができる。

#### 【0039】

実際、エストロゲン様作用性化学物質は、極微量で内分泌攪乱作用をすることが知られているため、エストロゲンに対して高感受性を示す本発明の遺伝子組み換えメダカは、上述の環境水の検査および被検物質の検査の両方において大変有用なものである。

#### 【0040】

##### 【実施例】

以下、本発明の実施例について記載する。

#### 【0041】

##### メダカ由来エストロゲン受容体cDNA のクローニング

##### 1. メダカ肝臓 cDNA ライブラリーの作成

メスメダカ成魚の肝臓20個から、RNeasy Maxi Kit (QIAGEN #75162) を用いて添付のプロトコールに従ってトータル RNA 10 mg を取得した。取得したトータル RNA 全量から、Oligotex<sup>TM</sup>-dT30<Super> (TaKaRa w9021B) を用いて添付のプロトコールに従って mRNA 100  $\mu$ g を単離した。これを材料にして、cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE SC200401) を用いて添付のプロトコールに従い cDNA 約10  $\mu$ g を合成した。合成した cDNA 1  $\mu$ g と  $\lambda$  ZAPII (STRATAGENE SC237211) 1  $\mu$ g を Ligation High (STRATAGENE LGK-101) を用いて添付のプロトコール

に従いライゲーションした。この反応液全量を GigapackIII Packaging Extracts (STRATAGENE SC200202) を用いて添付のプロトコールに従いパッケージングし、約百万個のファージから成る cDNA ライブラリーを作成した。

#### 【 0 0 4 2 】

##### 2. スクリーニング

ヒト由来エストロゲン受容体 cDNA をもつプラスミド pOR8 (Nature 320巻 ページ134-139, 1986年) 約 1  $\mu$ g を、EcoRI 制限酵素で切断後、全量を 1.0% のアガロースゲルにて電気泳動した。ゲルをエチジウムブロマイドで染色後、UV トランスイルミネーター上で DNA 断片のサイズを確認しながら、約 2.1 kb のエストロゲン受容体 cDNA 断片を含むゲル片を切り出した。このゲル片から Ultrafree-MC (Millipore) を用いて添付のプロトコールに従い、エストロゲン受容体 cDNA 断片を精製した。この cDNA 断片をプローブにして、"Molecular cloning - a laboratory manual" (第2版 J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ページ2.108 - 2.125, 1989年) に記載の方法で、上述の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、メダカエストロゲン受容体 cDNA をもつ組み換えファージを単離した。単離したファージから、ExAssist<sup>TM</sup> ヘルパーファージ (STRATAGENE SC237211) を用いて添付のプロトコールに従い、メダカエストロゲン受容体 cDNA をもつプラスミド pMER を得た。

#### 【 0 0 4 3 】

##### 3. 塩基配列の決定

塩基配列解析は、Applied Biosystems 373A DNA Autosequencer 装置を用い、Dye Terminator Cycle Sequencing 法により実施した。塩基配列を解析した結果、得られた cDNA は 620 アミノ酸からなるタンパクをコードし、このタンパクはヒト並びに他の脊椎動物のエストロゲン受容体とアミノ酸配列の相同性が高いことが分かった。従って、本 cDNA はメダカのエストロゲン受容体をコードしている。

#### 【 0 0 4 4 】

##### メダカ受精卵に注入するプラスミド pOL22 の作成

上述のように単離したメダカエストロゲン受容体 cDNA をメダカの細胞内で発

現させるために、本 cDNA の 5' 上流にメダカ  $\beta$ -アクチン遺伝子由来のプロモーターを、3' 下流に SV40 ウイルス由来のポリ(A) 付加シグナルを結合した。このキメラ遺伝子をもつプラスミド p0L22 を以下の方法で作成した。

## 【0045】

1. メダカ  $\beta$ -アクチンプロモーターをもつプラスミド p0BA-109 (Molecular Marine Biology and Biotechnology 3巻 ページ192-199 1994年) 約 1  $\mu$ g を SphI (TOYOBO)と PstI (TOYOBO) の 2 種類の制限酵素で添付のプロトコールに従い切断した。反応液を 70℃で 10 分間処理し、全量をさらに Klenow polymerase (TOYOBO) 2  $\mu$ L を用いて、添付のプロトコールに従い処理した。反応液を 70℃で 10分間処理後、全量を 1.0% のアガロースゲルにて電気泳動し、約 3.5 kb のメダカ  $\beta$ -アクチンプロモーター DNA 断片を含むゲル片を切り出した。このゲル片から Ultrafree-MC (Millipore) を用いて添付のプロトコールに従い、メダカ  $\beta$ -アクチンプロモーター DNA 断片を精製した。

## 【0046】

2. SV40 ポリ(A) シグナルをもつプラスミド pS65T-C1 (Clontech) 約 1  $\mu$ g を AseI (TOYOBO)と NheI (TOYOBO) の 2 種類の制限酵素で添付のプロトコールに従い切断した。反応液を 70℃で 10分間処理し、全量をさらに Klenow polymerase (Toyobo) 2  $\mu$ L を用いて、添付のプロトコールに従い処理した。反応液を 70℃で 10分間処理後、これに Bacterial alkaline phosphatase (TOYOBO) 2  $\mu$ L を加え混合後、60℃で 2 時間反応させた。全量を 1.0% のアガロースゲルにて電気泳動し、約 4.1 kb の SV40 ポリ(A) シグナル DNA 断片を含むゲル片を切り出した。このゲル片から Ultrafree-MC (Millipore) を用いて添付のプロトコールに従い、SV40 ポリ(A) シグナル DNA 断片を精製した。

## 【0047】

3. 上記で精製した二つの DNA 断片各 5  $\mu$ L (各 0.1  $\mu$ g の DNA を含む) と DNA Ligation System Ver.2 の I 液 (TaKaRa) 10  $\mu$ L を混合して 16℃で約 12時間インキュベートし、ライゲーションを行った。この反応液 10  $\mu$ L を用い、大腸菌 DH5 $\alpha$  (TaKaRa #9057) を形質転換し、得られた形質転換体より、Nucleo Bond Plasmid Kit (Clontech #K3001-1) を用いてプラスミドを単離し、p0L21

とした。

【0048】

4. プラスミド pOL21 約 1  $\mu$ g を SalI 制限酵素 (TOYOBO) で添付のプロトコールに従い切断した。反応液を 70°C で 10 分間処理し、全量をさらに Klenow polymerase (TOYOBO) 2  $\mu$ L を用いて、添付のプロトコールに従い処理した。反応液を 70°C で 10 分間処理後、これに Bacterial alkaline phosphatase (TOYOBO) 2  $\mu$ L を加え混合後、60°C で 2 時間反応させた。全量を 1.0% のアガロースゲルにて電気泳動し、約 7.1 kb の DNA 断片を含むゲル片を切り出した。このゲル片から Ultrafree-MC (Millipore) を用いて添付のプロトコールに従い、DNA 断片を精製した。

【0049】

5. メダカエストロゲン受容体 cDNA を増幅するために、プラスミド pMER (10 ng) を鋳型にして、プライマー 1 (5'-TCGGTGACATGTACCCTGAA-3' (配列番号 2)) と プライマー 2 (5'-CTGTGTGCTCAGTCTTGAAG-3' (配列番号 3)) 各々 25 pmole と KOD polymerase (TOYOBO) 1  $\mu$ L を用いて、添付のプロトコールに従い PCR 反応液 (50  $\mu$ L) を作成した。PCR 反応は、98°C 15 秒、65°C 2 秒、74°C 30 秒の条件で 25 サイクル反応を行った。反応の後、反応物を 4°C で保存した。PCR 反応物の一部 (5  $\mu$ L) を 1% アガロースゲルにて電気泳動し、産物の分子サイズが目的産物のサイズ (1.8 kb) とほぼ同じであることを確認した。残りの反応液から、SUPREC<sup>TM</sup>-02 (TaKaRa) を用いて添付のプロトコールに従い、増幅した DNA 断片を精製した。全量の精製した DNA 断片を T4 kinase (TOYOBO) 2  $\mu$ L を用いて添付のプロトコールに従いリン酸化し、反応後 70°C で 10 分間処理した。

【0050】

6. 上記ステップ 4 と 5 で最終的に得られた DNA 断片 (各 0.1  $\mu$ g) を DNA Ligation System Ver. 2 (TaKaRa) を用いて、添付のプロトコールに従いライゲーションした。この反応液 10  $\mu$ L を用い、大腸菌 DH5 $\alpha$  (TaKaRa #9057) を形質転換し、得られた形質転換体より、NucleoBond Plasmid Kit (Clontech #K3001-1) を用いてプラスミドを単離し、pOL22 とした。

【0051】

遺伝子組み換えメダカの作成法

1. 一あるいは二細胞期のメダカ受精卵を合計で約500個、受精後1時間以内に採取し、DNA注入まで6℃で保存した。受精卵の細胞質に、先端が鋭利に尖ったガラス管を用いて約100 pLのDNA溶液（1 mL あたり10  $\mu$ g のプラスミド pOL22 を含む）を実体顕微鏡下で注入した。その後、受精卵を50個ずつに分けて、それぞれ40 mL のメダカ生理食塩水（1 リットルあたりの含量は NaCl 7.5 g, KCl 0.2 g,  $\text{CaCl}_2$  0.2 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.02 g）中で25℃にて孵化するまでインキュベートした。約半数が孵化した。これらを水槽に移し、餌として食べ残さない程度のテトラミン（Tetra）を毎日3回にわけて約4ヶ月間与え、成魚になるまで飼育した。約50匹が成魚になるまで生き残った。

## 【0052】

2. 生き残った成魚から各々の尾ひれを半分ハサミで切り取り、これらからDNA抽出キット ISOHAIR（WAKO）を用いて添付のプロトコールに従い DNA（20  $\mu$ L）をそれぞれ抽出した。抽出された DNA（1  $\mu$ L）、二種類のプライマー（F1 5'-CTTCCGTGTGCTCAAACTCA-3'（配列番号4）と R1 5'-GTAGGAGGTCATAAAGAGGG-3'（配列番号5））各々50 pmole、並びに Ex Taq（TaKaRa Ex Taq RR001B）1  $\mu$ L を用いて、添付のプロトコールに従い PCR 反応液（100  $\mu$ L）を作成した。PCR 反応は、最初の変性（94℃ 2分）の後、94℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 90秒の条件で30サイクル反応を行った。最後に72℃ 6分反応の後、反応液を4℃で保存した。PCR 反応液の一部（10  $\mu$ L）を1% アガロースゲルにて電気泳動した。注入したキメラ遺伝子を持たないメダカの場合、野生メダカの染色体にもともと存在するエストロゲン受容体遺伝子から増幅された約1 kb のサイズの DNA バンドが検出される。これに対して、キメラ遺伝子を持つメダカの場合、約1 kb のバンドに加えてキメラ遺伝子由来の320 bp のバンドを検出した。結果、キメラ遺伝子を持つメダカ8匹を得た。

## 【0053】

3. キメラ遺伝子を持つメダカ8匹をそれぞれ野生メダカと交配させ、子孫を各々約100匹ずつ成魚になるまで飼育した。これらの尾ひれから DNA 抽出キット ISOHAIR（WAKO）を用いて添付のプロトコールに従い DNA（20  $\mu$ L）をそれぞれ



抽出した。抽出された DNA (1  $\mu$ L), 二種類のプライマー (5'-CTTCCGTGTGCTCAAACTCA-3' (配列番号 4) と 5'-GTAGGAGGTCATAAAGAGGG-3' (配列番号 5)) 各々 50 pmole、並びに Ex Taq (TaKaRa Ex Taq RR001B) 1  $\mu$ L を用いて、添付のプロトコールに従い PCR 反応液 (100  $\mu$ L) を作成した。PCR 反応は、最初の変性 (94  $^{\circ}$ C 2 分) の後、94  $^{\circ}$ C 30 秒、60  $^{\circ}$ C 30 秒、72  $^{\circ}$ C 90 秒の条件で 30 サイクル反応を行った。最後に 72  $^{\circ}$ C 6 分反応の後、反応液を 4  $^{\circ}$ C で保存した。PCR 反応液の一部 (10  $\mu$ L) を 1% アガロースゲルにて電気泳動した。キメラ遺伝子を持ち、320 bp のバンドが検出されたメダカを遺伝子組み換えメダカとした。結果、最初の 8 匹中、2 匹のみがキメラ遺伝子の子孫に伝達した。従って、二系統 (A および C と命名) の遺伝子組み換えメダカが得られた。ここで得られた遺伝子組み換えメダカは数匹であったが、これらと野生メダカの交配によって、それぞれの系統の遺伝子組み換えメダカを約 100 匹以上系統維持している。いずれの系統の遺伝子組み換えメダカも、野生メダカと交配して得られた子孫のうち約半数がキメラ遺伝子を持つことから、二本の相同染色体のうちの片方にキメラ遺伝子をもつ。

#### 【 0 0 5 4 】

##### 遺伝子組み換えメダカにおけるキメラ遺伝子の発現

A および C 系統の遺伝子組み換えメダカが野生メダカに比べて、より多くのエストロゲン受容体をコードする mRNA を生産していることを以下の方法で調べた。遺伝子組み換えメダカと野生メダカの交配で得られた約 30 個の受精卵、並びに野生メダカ同士の交配から得られた約 30 個の受精卵から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコールに従い RNA (30  $\mu$ L) を抽出した。RNA 1  $\mu$ L、それぞれ 50 pmole のプライマー三種類 (F1 (配列番号 4) と R1 (配列番号 5) は上述、R2 の塩基配列は 5'-GAGGGACTTTGTTCTTGCAC-3' (配列番号 6)) と Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech #27-9267-01) を用いて添付のプロトコールに従い RT-PCR 反応液 (50  $\mu$ L) を作成した。RT-PCR 反応は、最初 42  $^{\circ}$ C 30 分、95  $^{\circ}$ C 5 分反応の後、95  $^{\circ}$ C 30 秒、60  $^{\circ}$ C 30 秒、72  $^{\circ}$ C 90 秒の条件で 30 サイクル反応を行った。反応の後、反応液を 4  $^{\circ}$ C で保存した。RT-PCR 反応液の一部 (10  $\mu$ L) を 1% アガロースゲルにて電気泳動した。その後、"Molecular cloning - a laboratory manual" (第 2 版 J. Sambrook, E. F. Fritsch, T.

Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ページ9.31 - 9.62, 1989年) に記載の方法で、ゲル上のDNAをメンブレンにトランスファーし、エストロゲン受容体 cDNA の EcoRI-SalI 断片 (354 bp) をプローブにして、サザンハイブリダイゼーションを行った。A およびC 系統の遺伝子組み換えメダカの受精卵からは約300 bpの明瞭なバンドが検出された。バンドの濃さはC 系統の方がA 系統に比べて約二倍濃かったので、C 系統の遺伝子組み換えメダカの方がA 系統に比べてより多くのエストロゲン受容体をコードする mRNA を生産していると思われる。野生メダカの受精卵からはほとんどなにも検出されなかったので、野生メダカの受精卵におけるエストロゲン受容体mRNAの発現量はかなり低いものと判断された。

## 【 0 0 5 5 】

遺伝子組み換えメダカにおけるエストロゲンによる血栓形成

17 $\beta$ -エストラジオールを2 ng/L, 20 ng/L, 200 ng/L, 2  $\mu$ g/L, 1 mg/L, あるいは4 mg/L の濃度で含むメダカ生理食塩水 (各々40 mL) をそれぞれシャーレに入れ、これを三系列用意した。一系列目のシャーレにはそれぞれ野生メダカ同士の交配から得られた約30個の受精後12時間経過した受精卵(W)を入れた。二系列目のシャーレにはそれぞれA 系統の遺伝子組み換えメダカと野生メダカの交配で得られた約30個の受精後12時間経過した受精卵(A)を入れた。三系列目のシャーレにはそれぞれC 系統の遺伝子組み換えメダカと野生メダカの交配で得られた約30個の受精後12時間経過した受精卵(C)を入れた。シャーレを25℃にて3日間インキュベートした後、実体顕微鏡下でメダカ胚を観察し、血栓の形成を調べた。受精卵W は4 mg/L の濃度でほぼ100% 血栓を形成したが、これより低濃度ではほとんど血栓の形成は見られなかった。受精卵A は2 ng/L, 20 ng/L, 200 ng/L, 2  $\mu$ g/L, 1 mg/L, あるいは4 mg/L の濃度で、それぞれ1%, 3%, 8%, 49%, 55%, あるいは100% が血栓を形成した。受精卵C は同様の濃度で、それぞれ19%, 41%, 75%, 73%, 60%, あるいは100% が血栓を形成した。従って、受精卵A とC は野生メダカの受精卵に比べてそれぞれ千倍と十万倍以上エストロゲンに対して感受性が高くなっている。

## 【 0 0 5 6 】

## 【発明の効果】

以上説明したように、本発明の遺伝子組み換えメダカは、遺伝子導入される前のメダカと比べ、極めて低濃度のエストロゲンに対して敏感である。そのため、本発明の遺伝子組み換えメダカは、環境中に極微量に存在するエストロゲン様物質を、迅速、安価かつ簡易に、しかも連続的に検出できる新規な水生動物として大変有効である。これにより、社会問題である河川のエストロゲン汚染を検出することが可能となる。

## 【0057】

また、本発明の遺伝子組み換えメダカの受精卵を、エストロゲンを含有する水中で生育すると、血管中に血栓を形成することが観察される。そのため、本発明の遺伝子組み換えメダカは、ヒトにおいて経口避妊薬の使用やホルモン療法によるエストロゲンの摂取が原因で起こる血栓症の発症メカニズムを解明するための実験動物として有効である。従来、抗血栓症の研究にはラットやウサギが利用されているが、これらは実験動物として高価であることに加え、血栓を調べる際に血管造影剤を注射した後、特殊な装置が必要であった。これに対して本発明で利用したメダカは、受精卵が透明なため実体顕微鏡下で容易に血栓を連続的観察することが可能であり、生化学的解析のための試料の調製が容易である点で、安価で簡便であるという利点を奏する。

## 【0058】

更に、本発明の遺伝子組み換えメダカは、血栓症を治療する薬を開発する際に、血栓症のバイオアッセイ系のモデル動物として使用することができる。従来、抗血栓薬の開発は、注射による投与を前提としていたが、本発明のメダカを用いることにより経口抗血栓薬の大規模スクリーニングが可能となる。

## 【0059】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<120> Medaka fish having high sensitivity to estorgen.

<130> A000003885

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2764

<212> DNA

<213> Oryzias latipes

<220>

<221> CDS

<222> (211)..(1935)

<400> 1

gtctcgctgc tagatgcctg tcaggcaggc agagaggaag cagcccgtgt tgcgcagcac 60

atctgaggat gattcatgag taagagacag agctcggtgc agatcaggca gctgttcgga 120

ccagcactca gatccaggat cagcccagcc tcctcagagc tggagaccct ctccccacct 180

cgccctctgc cccgtgaccc cctcggtgac atg tac cct gaa gag agc cgg ggt 234

Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly

1

5

tct gga ggg gtg gct gct gtg gac ttt ttg gaa ggg acg tac gac tat 282

Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Phe Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr

10

15

20

gcc gcc ccc aac cct gcc acg act ccc ctt tac agc cag tcc agc acc 330

Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr

25

30

35

40

ggc tac tac tct gct ccc ctg gaa aca aac gga ccc ccc tca gaa ggc 378

Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly

45

50

55

agt ctg cag tcc ctg ggc agt ggg ccg acg agc cct ctg gtg ttt gtg 426

Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val

60

65

70

ccc tcc agc ccc aga ctc agt ccc ttt atg cat cca ccc agc cac cac 474

Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His Pro Pro Ser His His

75

80

85

tat ctg gaa acc act tcc acg ccc gtt tac aga tcc agc cac cag gga 522

Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Gly

90

95

100

gcc tcc agg gag gac cag tgc ggc tcc cgg gag gac acg tgc agc ctg 570

Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu

105

110

115

120

ggg gag tta ggc gcc gga gcc ggg gct ggg ggg ttt gag atg gcc aaa 618

Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys

125

130

135

gac acg cgt ttc tgc gcc gtg tgc agc gac tac gcc tct ggg tac cac 666

Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His

140

145

150

tat ggg gtg tgg tct tgt gag ggc tgc aag gcc ttc ttc aag agg agc 714

Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser

155

160

165

atc cag ggt cac aat gac tat atg tgc cca gcg acc aat cag tgc act 762

Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr

170

175

180

att gac aga aat cgg agg aag agc tgc cag gct tgt cgt ctt agg aag 810

Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys

185

190

195

200

tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa ggc ggt gtg cgc aag gac cgc att 858

Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile

205

210

215

cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg cgg aca ggc gtt ggt gat gga gac 906

Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp

220

225

230



aag gtt gta aag ggt cag gag cat aaa acg gtg cat tat gat gga agg 954

Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg

235

240

245

aaa cgc agc agc aca gga gga gga gga gga gga gga gga gga aga ctg 1002

Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu

250

255

260

tct gtg acc agc ata cct cct gag cag gtg ctg ctc ctc ctt cag ggc 1050

Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly

265

270

275

280

gcc gag ccc ccg ata ctc tgc tcg cgt cag aag ttg agc cga ccg tac 1098

Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr

285

290

295

acc gag gtc acc atg atg acc ctg ctc acc agc atg gca gac aag gag 1146

Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu

300

305

310

ctg gtc cac atg atc gcc tgg gcc aag aag ctc cca ggt ttt ctg cag 1194

Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln

315

320

325

ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg ctg ctg gag agc tcg tgg ctg gag 1242

Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu

330

335

340

gtg ctc atg atc ggc ctc att tgg agg tcc atc cac tgt ccc ggg aag 1290

Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys

345

350

355

360

ctc atc ttt gca caa gac ctc atc ctg gac agg aat gag gga gac tgc 1338

Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys

365

370

375

gtg gaa ggc atg acg gag atc ttc gac atg ctg ctg gcc act gct tcc 1386

Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser

380

385

390

cgc ttc cgt gtg ctc aaa ctc aaa cct gag gaa ttc gtc tgc ctc aaa 1434

Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys

395

400

405

gct att att tta ctc aac tcc ggt gct ttt tct ttc tgc acc ggc acc 1482

Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr

410

415

420

atg gag cca ctt cac aac agc gcg gcg gtt cag agc atg ctg gac acc 1530

Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr

425 430 435 440

atc aca gac gca ctc att cat tac atc agt cag tcg ggt tac ttg gcc 1578

Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala

445 450 455

cag gag cag gcg aga cgg cag gcc cag ctg ctc ctg ctg ctc tcc cac 1626

Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ser His

460 465 470

atc agg cac atg agc aac aaa ggc atg gag cac ctc tac agc atg aag 1674

Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys

475 480 485

tgc aag aac aaa gtc cct ctt tat gac ctc cta ctg gag atg ctc gat 1722

Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp

490

495

500

gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc aga gca ccc cag tcc ttg tcc caa 1770

Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln

505

510

515

520

gtc gac aga gac cct ccc tcc acc agc agc ggc ggg ggt gga atc gct 1818

Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ala

525

530

535

ccc ggt tct ata tca gca tct cga ggc aga atc gag agt ccg agc aga 1866

Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg

540

545

550

ggc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt cag tat gga ggg tcg cgt cct gac 1914

Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp

555

560

565

tgc acc ccg gcc ctt caa gac tgagcacaca gtccaaggcc cttttttgt 1965

Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp

570

575

ggctcaaggg ttcaggttgg gacaaggtga tgcttgattt aattttaaga attatttata 2025

aataagagtg gcgctgagag gagaagctcc cacaatgaac tgcctctgct tgggccagct 2085

tttgtgcagt cactttaatc tgcttatatt catctccttt gtaaacctga gcgtctcttt 2145

agcagctttt ttttgctctc caaacagcat gtggtagatt gtaagggtgc gtcccatgag 2205

ttctggtgat ttcaagaaaa tgagcagcta atgttttctg taaccgtctt gacccaagtg 2265

cacttcctct tggattaaag gggctaattg gcattatttt gtctcttgta catatgggat 2325

ggctaagaat aatgagagta attgtcagat tttgtgtaga acttaccac aaatgcaatt 2385

ttaaaataag atttaaaaac aaaagaggca agatcaaacc tgagagcact gaagacacgc 2445

tgtagaaagc tgggtaaatt tgttatccac gtctatctct ggaaaggact ttgttctctg 2505

tgccctgcagc tcattttactc tgaacttgct acttggttgaa catttggtgca cttgtccgtg 2565

tttttctagc actgtagctt atgaacgctg agaaagaatc taatgctttg atgcacagat 2625

ttgccttgta ttgtacatct cagccacaaa cgtacttttc gtccacaagt tgactgactg 2685

caccttgatt aaattgtcta aaagttcatt taaatgttga attctgtgaa aattaaaaag 2745

gcaattcctg tttctatatt

2764

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

tcggtgacat gtaccctgaa

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ctgtgtgctc agtcttgaag

20

<210> 4

<211> 20



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

cttccgtgtg ctcaaactca

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gtaggaggtc ataaagaggg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gagggacttt gttcttgac

20

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 極低濃度のエストロゲンに反応する遺伝子組み換えメダカを提供すること、前記メダカを用いて血栓を形成したメダカを作成する方法、および当該方法により作成された血栓を形成したメダカを提供すること、並びに前記メダカを用いてエストロゲン様作用性物質を検査する方法を提供すること。

【解決手段】 (1) 配列番号 1 に記載されている塩基配列の 211～1935 位を有するポリヌクレオチドを遺伝子導入した遺伝子組み換えメダカ；(2) (1) 記載の遺伝子組み換えメダカをエストロゲン存在下で生育させることを特徴とする血栓を形成したメダカの作成方法；(3) (2) 記載の方法により作成された血栓を形成したメダカ；(4) エストロゲン様作用性物質の検査方法において、(1) 記載の遺伝子組み換えメダカを検査用の水中で生育させる工程と、前記メダカに血栓が形成されるか否かを観察する工程とを具備することを特徴とする方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391012648]

1. 変更年月日	1997年 5月14日
[変更理由]	住所変更
住 所	広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
氏 名	広島大学長